ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 25, 4, 1991

УДК 576.895.122 : 577.154

© 1991

АКТИВНОСТЬ И СВОЙСТВА ЦИТОЗОЛЬНОЙ ПИРУВАТКИНАЗЫ ИЗ ТРЕМАТОДЫ ISOPARORCHIS HYPSELOBAGRI

А. Ю. Хаматова

Изучены активность и свойства пируваткиназы из цитозоля трематоды *Isoparorchis hypselobagri*. Предполагается, что пируваткиназа ригулирует направленность гликолиза у этой трематоды.

Пируваткиназе (ПК) отводится ключевая роль в регуляции гликолиза — основном источнике энергии у гельминтов. Активность ПК у паразитических червей, адаптированных к анаэробным условиям, низка по сравнению с гельминтами, обитающими в аэробных условиях (Ward e. a., 1968; Bosshe e. a., 1971; Barrett, Beis, 1973; Anya, Umezurike, 1978).

Бюдинг и Саз (Bueding, Saz, 1968) предположили, что у *Schistosoma mansoni, Hymenolepis diminuta* и в мышцах *Ascaris* направленность гликолиза регулируется соотношением активностей двух конкурирующих друг с другом ферментов: ПК и фосфоэнолпируваткарбоксикиназы (ФЭПКК), превращающих один и тот же субстрат, фосфоэнолпируват (ФЭП). У гельминтов-аэробов отношение активностей ПК к ФЭПКК значительно больше единицы; у видов, у которых гликолиз идет через присоединение CO_2 к ФЭП, оно меньше 1.

Бриант (Bryant, 1972) показал, что направление гликолиза у цестоды *Moniezia expansa* также может контролироваться активностью ПК. Фермент изучали у трематод *Dicrocoelium dendriticum* (Köhler, 1974), *Fasciola hepatica* (Prichard, 1976; Behm, Bryant, 1980), *Eurytrema pancreaticum* (Буренина, 1984), *Calicophoron ijimai* (Ярыгина и др., 1986); легочных нематод *Dictyocaulus viviparus* (Vaatstra, 1969) и *Rhabdias bufonis* (Anya, Umezurike, 1978). И хотя во многих работах указывается уровень активности ПК, лишь в некоторых из них изучали кинетику фермента.

Целью наших исследований явилось изучение активности и свойств ПК из трематоды *Isoparorchis hypselobagri.*

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Трематод *Isoparorchis hypselobagri* (Billet, 1898) (Trematoda: Isoparorchidae) извлекали из плавательного пузыря сомов *Silurus soldatovi* и *Parasilurus asotus*, выловленных из оз. Ханка. Гельминтов промывали дистиллированной водой, подсушивали фильтровальной бумагой и взвешивали. Гомогенизацию проводили в стеклянном гомогенизаторе в ледяной среде, состоящей из 0.1 М трис-HCl буфера pH 7.5, 0.25 М сахарозы и 0.005 М ЭДТА. Полученный гомогенат центрифугировали в рефрижераторной центрифуге при 1000 g в течение 15 мин. Осадок отбрасывали, а супернатант фильтровали через мельничный газ и рецентрифугировали при 12 000 g в течение 30 мин. Полученный цитозоль использовали для определения активности фермента.

Активность ПК (НФ 2.7.1.40) определяли методом Бюхера и Пфлейдерера (Bücher, Pfleiderer, 1955) по изменению оптической плотности реакционной смеси при 340 нм в течение 3 мин на спектрофотометре СФ-16. Полная реакционная смесь в конечном объеме 3 мл содержала в мМ: трис-HCl буфер pH — 7.5—50, KCl — 75, АДФ — 1 с Mn^{++} или 2 с Mg^{++}, $MnCl_2$ — 1 или $MgCl_2$ — 2, ФЭП — 0.5 с Mn^{++} или 2 с Mg^{++}, НАДН — 0.2, ФБФ — 0.4, ЛДГ — 3.6 ФЕ, энзимный белок 0.4—0.6 мг. Реакцию начинали добавлением субстрата. Активность выражали в нмолях превращенного субстрата в мин на мг белка. Для расчета активности использовали молярный коэффициент экстинкции пиридиндинуклеотидов (Horecker, Kornberg, 1948). Кажущиеся константы Михаэлиса (K_m) определяли графически методом двойных обратных величин по Лайнуиверу-Бэрку. Белок определяли по методу Лоури (Lowry e. a., 1951), используя бычий сывороточный альбумин для построения стандартной калибровочной кривой. Полученные данные обрабатывали статистически (Асатиани, 1965).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность ПК с ионами Mn^{++} составляет 44.6±2.2 нмоля, тогда как активность фермента с ионами Mg^{++} 55.2±2.4 нмоля. Для проявления активности ферменту требуются одновалентные и двувалентные катионы (рис. 1). Mg^{++} более эффективный двувалентный катион, чем Mn^{++}. Замена его на Mn^{++} снижает активность фермента на 23 %. 0.4 мМ ФБФ несколько снижает активность фермента с Mn^{++}, но активизирует Mg^{++}-зависимый фермент (см. таблицу). Насыщение Mg^{++} наступает при концентрации его в пробе 2 мМ; $K_{m(Mg^{++})}$ составляет 0.093 мМ, а насыщение Mn^{++} наступает при 1 мМ; $K_{m\,(Mn^{++})}$ — 0.18 мМ. Удаление из системы двувалентных катионов снижает активность ПК почти наполовину, на столько же снижает активность и выведение K^+.

Оптимум pH для ПК с Mn^{++} составляет 6.5, а с Mg^{++} 7.0. Активность фермента менялась незначительно в интервале pH 6.0—7.5, что отмечали ранее Ярыгина и др. (1986) для трематоды *Calicopcophoron ijimai*.

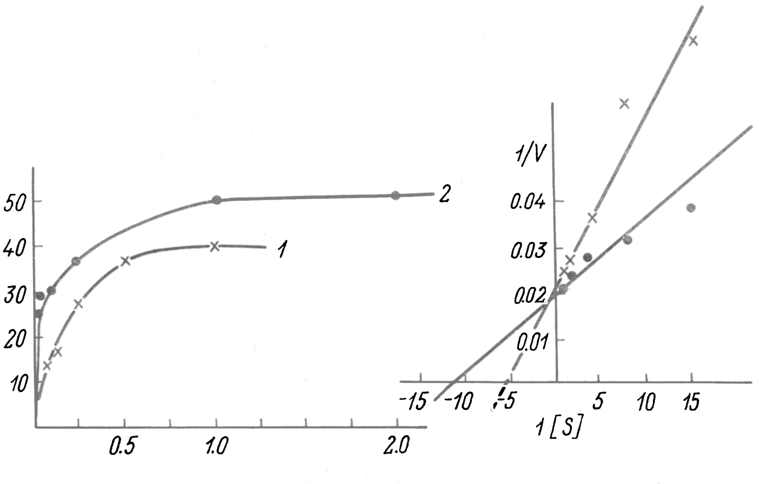

Рис. 1. Влияние концентрации ионов Mn^{++} и Mg^{++} на активность ПК. Здесь и на рис. 2, 3: внутри график двойных обратных величин.

По оси абсцисс — концентрация ионов Mn^{++} (*1*) и Mg^{++} (*2*) в mM; по оси ординат — активность ПК в нмолях НАДН/мин/мг белка.

Fig. 1. The effect of concentration of the ions Mn^{++} and Mg^{++} on the activity of PK.

Кофакторная специфичность ПК из *Isoparorchis hypselobagri*
Cofactor specificity of PK from *Isoparorchis hypselobagri*

Условия	Специфическая активность *	Условия	Специфическая активность *
Полная система (Mn^{++}, K^{+}, ФЭП, ЛДГ, АДФ)	100 (27)	—АДФ, +ИДФ	69.1 (3)
+ФБФ	87.9 (15)	—АДФ, —Mn^{++}, +ИДФ, +Mg^{++}	59.0 (3)
—Mn^{++}, +Mg^{++}	123.8 (9)	—АДФ, +ГДФ	69.5 (3)
—Mn^{++}, +Mg^{++}, +ФБФ	140.8 (27)	—АДФ, —Mn^{++}, +ГДФ, +Mg^{++}	55.7 (3)
—Mn^{++}	56.9 (3)	+4 мМ АТФ	0.0 (3)
—K^{+}	48.3 (3)	+5 мМ ГТФ	29.7 (3)
—ФЭП	0.0 (3)	+5 мМ ИТФ	35.4 (3)
—ЛДГ	0.0 (3)	+4 мМ аланин	100 (6)
—АДФ	38.2 (3)	+4 мМ малат	85.7 (6)
—АДФ, —Mn^{++}, +Mg^{++}	8.3 (3)	+4 мМ малат, —Mn^{++}, +Mg^{++}	91.1 (6)

Примечание. * Выражена в процентах от активности полной системы

Скорость энзиматической реакции зависит от концентрации субстрата, которым служит ФЭП. Насыщение ФЭП наступает при концентрации его 0.5 мМ с Mn^{++} и 2 мМ с Mg^{++}. Характер насыщения субстратом с обоими катионами гиперболический (рис. 2). Фермент имеет относительно низкое сродство к ФЭП. Кажущаяся K_m для ФЭП с Mn^{++} составляет 0.05 мМ, а с Mg^{++} 0.25 мМ.

Для проявления активности ферменту требуется наличие динуклеотидов. Наиболее эффективным динуклеотидным кофактором является АДФ. Выведение его из системы снижает активность ПК на 62 % в случае с Mn^{++}-зависимым ферментом и на 92 % с Mg^{++}-зависимым. ГДФ и ИДФ действовали на фермент примерно одинаково. Замена АДФ на ГДФ и ИДФ сопровождалась падением активности на 30 %, когда Mn^{++} применялся как двувалентный катион. При применении катионов Mg^{++} замена АДФ на ИДФ и ГДФ снижала активность ПК на 40 % (см. таблицу). Кривые зависимости скорости реакции от концентрации АДФ имели гиперболический характер (рис. 3). K_m для АДФ с ионами Mn^{++} составляла 0.167 мМ. Сродство фермента к АДФ с ионами Mn^{++} в два раза выше, чем с ионами Mg^{++}, K_m для АДФ с ионами Mg^{++} составляла 0.33 мМ.

ПК чувствительна к ингибированию трифосфатами. Наиболее эффективными оказался АТФ, который в концентрации 4 мМ полностью ингибировал активность фермента. ИТФ ингибировал фермент на 35 %. ГТФ на 30 и 52 % с ионами Mn^{++} и Mg^{++} соответственно. Аланин в такой же концентрации не ингибировал активность фермента, тогда как малат несколько снижал скорость энзиматической реакции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Активность ПК у различных паразитических червей сильно варьирует. У *Schistosoma mansoni*, основной продукт ферментации которых — лактат, активность ПК высока и достигает 1150—2030 нмолей/мин/мг белка, в то время как *Ascaris lumbricoides*, которые продуцируют сукцинат, обладают очень низкой активностью ПК — 7.0 нмолей. *Hymenolepis diminuta*, продуцирующие как сукцинат, так и заметные количества лактата, занимают промежуточное положение. Активность ПК у них составляет 105 нмолей (Bueding, Saz, 1968). Активность ПК у трематоды *Eurytrema pancreaticum* (Буренина, 1984) равна 99.6 нмолей, у *Calicophoron ijimai* 60.3 нмолей (Ярыгина и др., 1986).

Isoparorchis hypselobagri имеет сложный жизненный цикл. Мариты обитают в плавательном пузыре сома и, по предположению Сидики и Низами (Siddiqi,

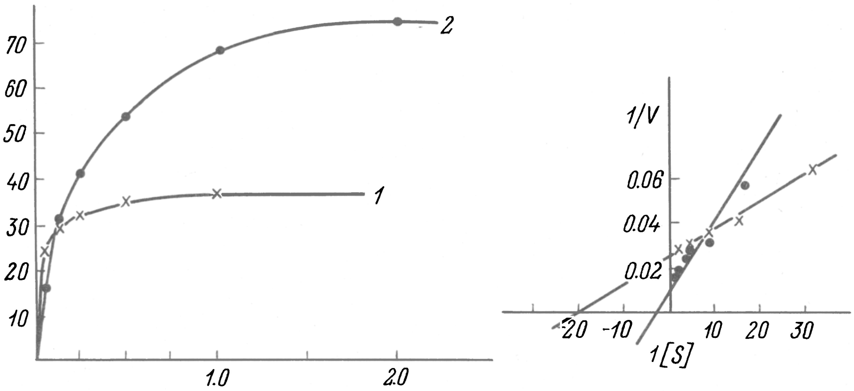

Рис. 2. Влияние концентрации ФЭП на активность ПК. Внутри график двойных обратных величин.
1 — Mn^{++}-зависимая ПК; *2* — Mg^{++}-зависимая ПК; по оси абсцисс — концентрация ФЭП в mM; по оси ординат — активность ПК в нмолях НАДН/мин/мг белка.

Fig. 2. The effect of concentration of PEP on the activity of PK.

Nizami, 1975), являются аэробами. Поэтому можно было ожидать у них, как и у других гельминто-аэробов, наличие высокоактивной ПК. Однако активность фермента была относительно низкой и составляла 44.6 нмолей с ионами Mn^{++} и 55.2 нмоля с ионами Mg^{++}. Возможно, это объясняется тем, что заражение сомов изопарорхисом происходит при поедании рыб, инвазированных мезоцеркариями, живущими в условиях дефицита кислорода в полости тела рыб.

ПК изопарорхисов более активна с ионами Mg^{++}, чем с ионами Mn^{++}. По литературным данным, двувалентные катионы по-разному влияют на ПК из тканей червей. Большинство изученных гельминтов имеют ПК, более активную с ионами Mn^{++}. Это и *Calicophoron ijimai* (Ярыгина и др., 1986), и *Moniezia expansa* (Bryant, 1972), и *Dicrocoelium dendriticum* (Köhler, 1974). Лишь у шистозом активность фермента с Mn^{++} была вдвое ниже, чем с Mg^{++}. Mn^{++} высокоэффективен и для ПК *Fasciola hepatica* (Prichard, 1976), Mg^{++} в отсутствие ФБФ малоэффективен. Однако при добавлении ФБФ активность ПК с Mg^{++} незначительно отличается от таковой в присутствии Mn^{++} и ФБФ. Ярыгина и другие (1986) отмечают сильный стимулирующий эффект ФБФ на

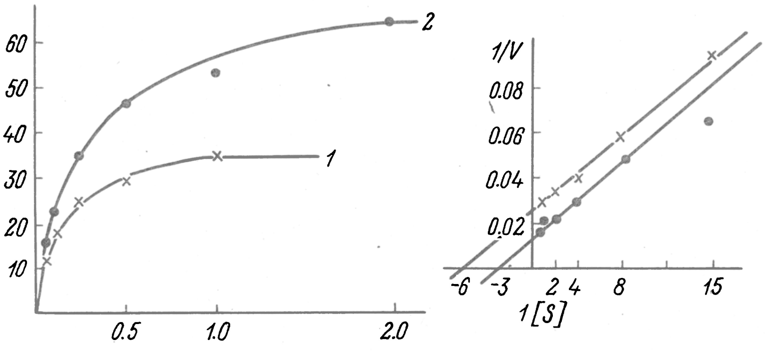

Рис. 3. Влияние концентрации АДФ на активность ПК. Внутри график двойных обратных величин.
1 — Mn^{++}-зависимая ПК; *2* — Mg^{++}-зависимая ПК; по оси абсцисс — концентрация АДФ в mM; по оси ординат — активность ПК в нмолях НАДН/мин/мг белка.

Fig. 3. The effect of concentration of ADP on the activity of PK.

Mg^{++}-зависимый фермент у *Calicophoron ijimai*, тогда как на Mn^{++}-зависимый фермент ФБФ не влиял, однако увеличивал сродство последнего к ФЭП. Активация фермента ФБФ наблюдалась также и у других гельминтов (Bryant, 1972; Köhler, 1974; McManus, 1975; Prichard, 1976).

Для ПК из *Isoparorchis hypselobargi*, так же как и других гельминтов (Bryant, 1972; McManus, James, 1975; Prichard, 1976; Behm, Bryant, 1980; Ярыгина и др., 1986), для проявления максимальной активности необходимо присутствие нуклеотидов, лучшим из которых был АДФ. Фермент не отличается строгими требованиями к динуклеотидному кофактору. Он активен и с ГДФ, и с ИДФ, но активность ПК с этими нуклеотидами снижалась на 30—40 %.

По отношению к различным модуляторам ПК из изопарорхисов очень похожа на ПК из *Calicophoron ijimai* (Ярыгина и др., 1986). L-аланин по-разному влияет на активность фермента у гельминтов. На ПК из *Moniezia expansa* (Bryant, 1972) и *Ligula intestinalis* (McManus, 1975), *Calicophoron ijimai* (Ярыгина и др., 1986) он влияния не оказывал, так же как и на изученных нами *Isoparorchis hypselobagri*, в то время как фермент из *Microphallus similis* (McManus, James, 1975) ингибировался L-аланином.

ПК *I. hypselobagri* слегка ингибировалась малатом и значительно трифосфатами, так же как и фермент из *Fasciola hepatica* (Köhler, 1976), *Calicophoron ijimai* (Ярыгина и др., 1986) и других гельминтов.

ПК из изопарорхисов по своим свойствам занимает промежуточное положение между ПК-I и ПК-III. С ПК-III (мускульной) ее сближают гиперболическая кинетика насыщения субстратом и кофакторами и отсутствие строгих требований к нуклеотидному кофактору. На сходство с ПК-I (печеночной) указывает относительно низкая специфическая активность, низкое сродство к ФЭП, регуляция ФБФ, чувствительность к ингибированию АТФ. Известно, что ПК- I является важной контрольной единицей в гликолизе, поэтому можно предположить, что ПК изопарорхисов может быть ответственна за регулирование гликолиза у этой трематоды.

Список литературы

Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. М.: Наука, 1965. С. 173—180.

Буренина Э. А. Пируваткиназа и фосфоэнолпируваткарбоксикиназа в трематодах Eurytrema pancreaticum и турбелляриях Phagocata sibirica // Современные проблемы эволюционной биохимии и происхождения жизни. Петрозаводск, 1984. С. 52—53.

Ярыгина Г. В., Выхрестюк Н. П., Буренина Э. А. Пируваткиназа из трематод Calicophoron ijimai и возможность ингибирования ее некоторыми антгельминтными препаратами // Паразитология. 1986. Т. 20, вып. 1. С. 53—60.

Anya A. O., Umezurike G. M. Respiration and carbohydrate energy metabolism of the lung-dwelling parasite Rhabdias bufonis (Nematoda : Rhabdiasoidea) // Parasitol. 1978. Vol. 76, N 1. P. 21—27.

Barrett J., Beis I. Studies on glycolysis in the muscle tissue of Ascaris lumbricoides (Nematoda) // Comp. Biochem. Physiol. 1973. Vol. 44, N 3B. P. 751—761.

Behm C. A., Bryant C. Regulatory properties of a partially purified preparation of pyruvate kinase from Fasciola hepatica // Int. J. Parasitol. 1980. Vol. 10. P. 107—114.

Bossche van den H., Schaper J., Borgers M. Some aspects of carbohydrate metabolism of Syphacia muris, the rat pinworm // Comp. Biochem. Physiol. 1971. Vol. 38B, N 1. P. 43—52.

Bryant C. Metabolic regulation in Moniezia expansa (Cestoda); The role of pyruvate kinase // J. Parasitol. 1972. Vol. 2, N 3. P. 333—341.

Bücher T., Pfleiderer G. Pyruvate kinase // Methods in Enzymology. Vol. 1. N. Y.: Acad. press. 1955. P. 435—440.

Bueding E., Saz H. J. Pyruvate kinase and phoshoenolpyruvate carboxykinase activities of Ascaris muscle, Hymenolepis diminuta and Schistosoma mansoni // Comp. Biochem. Physiol. 1968. Vol. 24, N 2. P. 511—518.

Horecker B. L., Kornberg A. The extinction coefficient of the reduced band of pyridine nucleotides // J. Biol. Chem. 1948. Vol. 175, N 1. P. 385—390.

Köhler P. Metabolic role of pyruvate kinase in the trematode Dicrocoelium dendriticum // Comp. Biochem. Physiol. 1974. Vol. 49, N 2B. P. 335—344.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, N 1. P. 265—275.
McManus D. P. Pyruvate kinase in the plerocercoids of Ligula intestinalis (Cestoda : Pseudophyllides) // J. Biochem. 1975. Vol. 6, N 1. P. 79—84.
McManus D. P., James B. L. Pyruvate kinase and carbon dioxide fixating enzymes in the digestive gland of Littorina saxatilis rudis (Maton) and in the daughter sporocysts of Microphallus similis (Jäg) (Digenea : Microphallidae) // Comp. Biochem. Physiol. 1975. Vol. 51, N 2B. P. 299—306.
Prichard R. K. Regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in adult Fasciola hepatica (Trematoda) // J. Parasitol. 1976. Vol. 6, N 3. P. 227—233.
Siddiqi W. A., Nizami A. H. Gas content of swin bladder of Wallago attu and oxygen consumption in Isoparorchis hypselobagri (Trematoda) // Z. Parazitenk. 1975. Vol. 47. P. 263—268.
Vaatstra W. G. Intermediary metabolism of the cattle lungworm Dictyocaulus viviparus // Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologie und Chemie. 1969. Vol. 350. P. 701—709.
Ward C. W., Schofield P. J., Jonstone I. L. Pyruvate kinase in Haemonchus contortus larvae // Comp. Biochem. Physiol. 1968. Vol. 24. P. 643—647.

БПИ ДВО АН СССР,
Владивосток

Поступила 11.11.1989

ACTIVITY AND PROPERTIES OF CYTOSOLE PYRUVATE KINASE FROM THE TREMATODE ISOPARORCHIS HYPSELOBAGRI

A. Ju. Khamatova

Key words: Isoparorchis hypselobagri, piruvate kinase, activity

SUMMARY

Activity and properties of pyruvate kinase (PK) from the cytosole of the trematode *Isoparorchis hypselobagri* have been studied. It has been shown that PK can be responsible for the regulation of glycolysis in these worms. To display its activity the enzyme needs substrate, dinucleotides, univalent and bivalent kations. The activity with the ions Mg^{++} was higher than that with the ions Mn^{++}. PK was inhibited by ATP and malate. L-alanine did not inhibit the enzyme.